



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07123987 A**

(43) Date of publication of application: 16 . 05 . 95

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**

**C12P 21/02**

///(C12P 21/02 , C12R 1:69 ), (C12P 21/02 , C12R 1:80 ), (C12P 21/02 , C12R 1:865 )

(21) Application number: **05303476**

(22) Date of filing: 08 . 11 . 93

(71) Applicant: **AMANO PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **WASHIZU KINYA**  
**YAMAGUCHI SHOTARO**

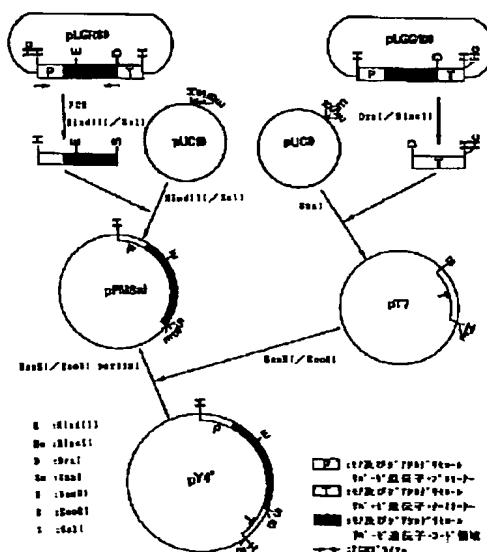
(54) **PLASMID FOR EXPRESSING SECRETION OF POLYPEPTIDE USABLE IN MOLD AND YEAST AND PRODUCTION OF POLYPEPTIDE USING THE SAME**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a new plasmid capable of secreting and expressing a useful protein and peptide such as a physiologically active peptide, a hormone or an enzyme by a mold or a yeast.

**CONSTITUTION:** This plasmid has a promoter capable of functioning with a mold and a yeast, further a signal and a terminator required for the secretion and a DNA region, replicable and selectable in *Escherichia coli* and is operable with the mold and yeast, e.g. a plasmid pY4'. The exemplified plasmid is constructed according to a scheme shown in the figure and a plasmid pLGR80 is obtained by ligation of a plasmid pLGG300 to a 0.63-kb *XhoI*/*NcoI* fragment derived from a cDNA. A plasmid pLGG100, the plasmid pLGG300 and an about 1.0-kb cDNA fragment are prepared by inserting a mono- and a diacylglycerol lipase gene 2.0-kb *HindIII* fragment of *Penicillium camembertii* U-150 strain into a *HindIII* site of an *Escherichia coli* vector pUC19.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-123987

(43) 公開日 平成7年(1995)5月16日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B		
// (C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:69)				
	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A	
	審査請求	未請求	請求項の数10	F D (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-303476  
(22) 出願日 平成5年(1993)11月8日

(71) 出願人 000216162  
天野製薬株式会社  
愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号  
(72) 発明者 鷺津 欣也  
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株  
式会社筑波研究所内  
(72) 発明者 山口 庄太郎  
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株  
式会社筑波研究所内

(54) 【発明の名称】 糸状菌および酵母で使用可能なポリペプチド分泌発現用プラスミドおよびそれを用いたポリペプチドの製造法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、糸状菌もしくは酵母を宿主として有用蛋白質およびペプチドを分泌発現させるために必要なDNA断片を有するプラスミドと、それを用いた有用蛋白質およびペプチドの製造法を提供する。

【構成】 糸状菌および酵母で機能するプロモーターとターミネーターを有し、分泌に必要なシグナルとして、ペニシリウム・カマンベルチーのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子を有し、大腸菌で複製および選択可能なDNA領域を有する糸状菌および酵母で使用可能なポリペプチド分泌発現用プラスミドおよびこれを用いたポリペプチドの製造法である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】糸状菌および酵母で機能するプロモーターを有し、分泌に必要なシグナル及びターミネーターを有し、大腸菌で複製および選択可能なDNA領域を有する糸状菌及び酵母で使用可能なポリペプチド分泌発現用プラスミド。

【請求項2】プロモーターが、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーターである請求項1記載のプラスミド。

【請求項3】分泌に必要なシグナルが、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼをコードするDNA配列である請求項1記載のプラスミド。

【請求項4】ターミネーターが、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のターミネーターである請求項1記載のプラスミド。

【請求項5】分泌に必要なシグナルとターミネーターの間に目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体をコードするDNAを有する請求項1記載のプラスミド。

【請求項6】分泌に必要なシグナルのペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼをコードするDNA配列が、該リパーゼ遺伝子のうちの、プレプロ領域をコードするDNA配列、プレプロ領域およびN末端領域をコードするDNA配列、プレプロ領域及び成熟タンパク質をコードするDNA配列、プレプロ領域及びC末端アミノ酸1残基が欠失した成熟タンパク質をコードするDNA配列の何れかである請求項3記載のプラスミド。

【請求項7】目的のポリペプチドが、ザルコファーガ・ペレグリナ由来の抗菌性蛋白質ザーペンシンである請求項5記載のプラスミド。

【請求項8】請求項5記載のプラスミドを、適当な形質転換ベクターを用い糸状菌もしくは酵母に導入し、得られた形質転換体を栄養培地で培養し、培養物中にポリペプチドを蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするポリペプチドの製造法。

【請求項9】糸状菌が、アスペルギルス・オリゼ又はペニシリウム・カマンベルチイである請求項8記載のポリペプチドの製造法。

【請求項10】酵母が、サッカロマイセス・セレビシエである請求項8記載のポリペプチドの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、糸状菌もしくは酵母を宿主として有用蛋白質およびペプチドを分泌発現させるために必要なDNA断片を有するプラスミドと、それを用いた有用蛋白質およびペプチドの製造法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】遺伝子工学技術においては、目的とする蛋白質の生産量は、プロモーター、ターミネーターなどの転写に関わる因子、アミノ酸コドンの種類など翻訳に関わる因子、蛋白質への糖鎖付加、発現した蛋白質の細胞内での存在様式（分泌過程における移動も含む）などの翻訳後に関わる因子、遺伝子のコピー数の因子、宿主由来のプロテアーゼなど発現蛋白質の安定性に関わる因子など、多くの因子により影響を受ける。

【0003】糸状菌におけるプロモーターを異種蛋白質高発現に利用した例は、アスペルギルス・ニガー由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター（Biotechnology, 5, 369 (1987)）、トリコデルマ・リーセイ由来のセロビオハイドロラーゼI遺伝子のプロモーター（Biotechnology, 7, 596 (1989)）、アスペルギルス・オリゼ由来のアルファ-アミラーゼ遺伝子のプロモーター（Biotechnology, 6, 1419 (1988)）の場合などがある。しかしながらペニシリウム（Penicillium）属由来のプロモーターを異種蛋白質高発現に利用した例はなかった。

【0004】また、使用する宿主は、一つのプロモーターに対し通常そのプロモーターの供与菌のみが使用できるのみであり、一つのプロモーターが複数の糸状菌を宿主として効率よく機能した例、あるいはさらに糸状菌と酵母両宿主において利用可能なプロモーターを用いた異種蛋白質の発現用プラスミドは存在しなかった。

【0005】更に、遺伝子工学技術を用いて異種蛋白質の生産を行う場合、単離・精製などのダウンストリーム・プロセスを容易にするため異種蛋白質を菌体外に分泌させることも重要な因子であり、このために、用いる宿主生物由来の分泌蛋白質のシグナルペプチド、もしくはその生物において機能するシグナルペプチドを、目的のポリペプチドの上流に導入する手法が用いられたり、あるいはまた、分泌蛋白質と目的のポリペプチドの融合蛋白質として発現させる方法も用いられている。

【0006】しかし、宿主としてアスペルギルス・ニドランス、分泌に必要なシグナルとしてアスペルギルス・ニガー由来のグルコアミラーゼを用いた例（Biotechnology, 5, 369 (1987)、Biotechnology, 5, 713 (1987)）、宿主としてアスペルギルス・アワモリ、分泌に必要なシグナルとしてアスペルギルス・アワモリ由来のグルコアミラーゼを用いた例（Biotechnology, 8, 435 (1990)）、宿主としてトリコデルマ・リーセイ、分泌に必要なシグナルとしてトリコデルマ・リーセイ由来のセロビオハイドロラーゼIを用いた例（Biotechnology, 7, 596 (1989)）があるのみであり、属を異にした複数の糸状菌および酵母で利用可能な分泌に必要なシグナルを用いて異種蛋白質の分泌発現に成功した例はこれまでに存在していなかった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】このように、発現宿主として糸状菌及び酵母のいずれにも適用可能で、且つ

又、発現された異種蛋白質の菌体外への分泌を促進させ得る形質転換用プラスミドが創製されるならば、宿主の使い分けが可能となり、それによって、天然には微量にしか存在しない多くの生理活性物質の効率的な生産が可能となり、ひいては、これら物質の医薬への応用もより促進されうる。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーターおよび分泌に必要なシグナルが、本菌株中においてのみならず他の糸状菌および酵母中において機能することを見だし、これを用いて、複数の糸状菌および酵母において分泌発現せしめるための新規発現プラスミドを構築すると共に、またその分泌発現プラスミドを用いて目的の有用蛋白質およびペプチドを糸状菌および酵母により分泌生産させることに成功し、本発明を完成させた。

【0009】本発明の新規分泌発現プラスミドは、糸状菌および酵母において機能するプロモーター、分泌に必要なシグナル、ターミネーターさらには大腸菌で複製および選択可能なDNA領域を有するものである。

【0010】プロモーターは、糸状菌および酵母において機能するものであればいずれでもよいが、具体的には、アスペルギルス・ニガーのβ-グルコシダーゼ遺伝子(Mol. Gen. Gen., 194, 494 (1984))、リゾプス・ニベウスのグルコアミラーゼ遺伝子(Agric. Biol. Chem., 50, 957 (1986))、リゾプス・ニベウスのアスパルティック・プロテイナーゼ遺伝子(Agric. Biol. Chem., 54, 1771 (1990))、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子(Gene, 103, 61 (1991))のプロモーター等が挙げられる。

【0011】より好適には、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーターが挙げられる。

【0012】分泌に必要なシグナルも、糸状菌および酵母において機能するものであればいずれでもよいが、具体的にはペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼの、プレプロ領域、プレプロおよびそれに続くN末端領域、プレプロ領域および成熟蛋白質のコード領域あるいはプレプロ領域およびC末端に1アミノ酸残基欠失した成熟蛋白質のコード領域等が挙げられる。

【0013】またターミネーターは、プロモーターほど厳密に選択されるべきものではないが、具体的にはペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のターミネーター等が挙げられる。

【0014】そして、本発明の新規分泌発現プラスミドは、以下の条件をも備えている。

【0015】(1)発現させるべき目的のポリペプチドをコードするDNA断片を、分泌に必要なシグナルとターミネーターの間に挿入するのを容易にするため、分泌に必要なシグナルとターミネーターの接続部に3つの制限酵素認識部位が導入されていること。

【0016】(2)目的のポリペプチドを挿入した後の

【プロモーター分泌に必要なシグナル-目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体をコードするDNA断片-ターミネーター】からなる発現カセットが構築され、そして該発現カセットを発現宿主として選択した菌株に対する形質転換プラスミドに挿入するのを容易にするための別の制限酵素認識部位が導入されていること。

【0017】(3)モノおよびジアシルグリセロールリパーゼのコード領域内の適当な制限酵素部位を利用して、任意の長さの分泌に必要なシグナルを有する発現カセットを構築することが出来ること。この場合の任意の長さの分泌に必要なシグナルとしては、例えばプレプロ領域、プレプロおよびN末端領域、プレプロおよび成熟体領域などが挙げられる。

【0018】(4)分泌に必要なシグナルと目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体の接合部のアミノ酸配列は、DNA断片の接合のために人工のアミノ酸配列になる場合もあり、また、Lys-Ar gなどのプロセッシングに必要なアミノ酸配列を意図的に導入することもあり、あるいは、モノおよびジアシルグリセロールリパーゼのC末端から3番目および2番目にLys-Ar g配列が存在し、この位置でプロセッシングが起こることが知られているので、分泌に必要なシグナルと目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体の接合部にこの配列を利用することも可能であること。

【0019】本発明の新規分泌発現プラスミドの構築は、例えば以下の様にして行うことが出来る。

【0020】遺伝子のプロモーターおよびコード領域、ターミネーター領域のそれぞれの両端に部位特異的変異導入法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 488 (1985))により適当な制限酵素認識部位を導入後、プロモーターおよびコード領域、ターミネーター領域を制限酵素により切り出し、DNA断片として単離し、両断片をもとの遺伝子と同じ順序で、大腸菌のベクターたとえばpUC19に挿入して得られる。

【0021】プロモーターおよびコード領域、ターミネーター領域のDNA断片は、PCR法(Science, 230, 1350 (1985))により増幅し得ることも可能である。

【0022】本発明は、さらに酵素、ホルモン、生理活性ペプチドもしくは蛋白質を、糸状菌および酵母を宿主として製造する方法をも開示するものであり、例えば、次のステップにより成し遂げられる。

【0023】(1)発現カセットの構築(プラスミドpY4'への目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体をコードするDNA断片の挿入)

(2) 形質転換-発現プラスミドの構築 (発現カセットの形質転換ベクターへの挿入)

(3) 形質転換-発現プラスミドの宿主菌株への導入

(4) 形質転換体の培養

以下に順を追って説明する。

【0024】(1) 発現カセットの構築 (プラスミドpY4'への目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体をコードするDNA断片の挿入)

目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体をコードするDNAのN末端アミノ酸コドンの上流に、および終止コドンの下流に適当な制限酵素部位を、部位特異的変異法もしくはPCR法によりそれぞれ導入し、これらの制限酵素付着部位を両端にもつDNA断片を、プラスミドpY4'の適当な制限酵素部位に挿入する。

【0025】この場合分泌に必要なシグナルとして選択したアミノ酸配列即ちモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロ領域、プレプロおよびN末端領域もしくはプレプロ領域および成熟体のアミノ酸配列と、挿入される目的のポリペプチドの前駆体もしくは成熟体のアミノ酸配列は、読み取りフレームが合致するように留意する。

【0026】これはPCRの際のプライマーのデザインや部位特異的変異を駆使することにより可能であり、目的のポリペプチド前駆体もしくは成熟体をコードするDNAは、クローニングにより得られた遺伝子もしくはcDNAであっても、化学合成により得られたものであってもよく、またイントロンを含む遺伝子であっても、そのイントロン中に宿主中でスプライシングが起こる様な配列を有するものであれば使用可能である。

【0027】(2) 形質転換-発現プラスミドの構築 (発現カセットの形質転換ベクターへの挿入)

(1) で構築した発現カセットを宿主糸状菌もしくは酵母細胞中へ導入するため、形質転換体の選択に必要なマーカー遺伝子を有するプラスミドすなわち形質転換ベクターに、発現カセットを挿入する。形質転換ベクターはそれぞれの宿主に応じて適宜選択する。糸状菌の場合、コトランスホメーション(Co-transformation)が可能であるので、糸状菌を宿主とする場合は必ずしもこのステップは必要としない。

【0028】(3) 形質転換-発現プラスミドの宿主菌株への導入

(2) で得られた形質転換-発現プラスミドを用いて、公知の方法で糸状菌 (例えば Mol. Gen. Gent., 218, 99 (1989)) もしくは酵母 (例えば J. Bacteriol., 153, 163 (1983)) を形質転換する。コトランスホメーションを行う場合は、形質転換-発現プラスミドの代わりに(1)で得られた発現カセットのDNA断片もしくは発現カセットを有するプラスミドと形質転換プラスミドの混合液を用いる。

【0029】(4) 形質転換体の培養

(3) で得られた形質転換体を、適当な培地・培養条件で培養し目的のポリペプチドを生産させる。この場合、プロモーターが最も機能する培地・培養条件で培養を行うのが好ましい。生産された組換え型の目的のポリペプチドは、適当な方法で定性、定量し、また必要に応じて単離・精製される。

【0030】目的のポリペプチドは、いかなるものであってもよいが、例えばザルコファーガ・ベレグリナ由来のザーペシンが挙げられる。

10 【0031】以下に実施例を用いて、本発明を詳細に説明する。尚、本明細書においては、遺伝子操作手法は特に記載しない限り成書 (例えば「モレキュラー・クローニング」第2版、サンプルック、フリッシュ、マニアチス編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーズ出版、(1989)) に従って行った。

【0032】

【実施例】

実施例1

プラスミドpY4'の構築

20 ペニシリウム・カマンベルチイ U-150株のモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子 2.0-kb HindIII断片を大腸菌ベクターpUC19 (東洋紡社製、Gene, 33, 103 (1985)) のHindIII部位に挿入したプラスミドpLGG100、pLGG300 (これら両プラスミドは、2.0-kb HindIII断片が互いに逆方向に挿入されている) および約1.0-kb cDNA断片 (Gene, 103, 61 (1991)) を材料に用いた。

【0033】このモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子およびcDNAは、ペニシリウム・カマンベルチイ U-150株 (ペニシリウム・エスピー(Penicillium sp.) U-150、FERM P-10452。この菌株は後にペニシリウム・カマンベルチイ(Penicillium camembertii)と同一とされた(Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 720 [1991])。より公知の方法 (Gene, 103, 61 (1991)) により取得することが可能である。

【0034】まずイントロンを含まないモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子を構築した。pLGG300を制限酵素NcoI、XhoIで部分分解し分解混合物を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、2つのイントロンを含む領域 0.73-kb XhoI/NcoI断片が除かれた約4.0-kb XhoI/NcoI断片を単離・精製した。このDNA断片と、cDNA由来の0.63-kb XhoI/NcoI断片をライゲーションしpLGR80を得た (図1)。

【0035】プロモーターおよびコード領域を含むDNA断片は、pLGR80を鋳型としてPCR法により増幅した。PCR反応のための上流プライマーとして、

M4': 5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTA-3'

下流プライマーとして、

Sal: 5'-GCTTGATCTAAATTGTCGACCCTCTTGAATG-3'

50 をサイクロンプラスDNA合成機 (ミリジェン・バイオサーチ社製) を用いて合成した。PCR反応は、Gene A

7

mp™ kit (パーキンエルマージャパン社製) を用い、同社のサーマル・サイクラー (DNA増幅装置) により行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

## 【0036】

H <sub>2</sub> O	63.0 μl
[10x] Reaction buffer	10.0 μl
dNTPs, Mix., 1.25 mM	16.0 μl
上流プライマー-M4', 20 μM	5.0 μl
下流プライマー-Sal, 20 μM	5.0 μl
pLGG300, 2 ng/μl	0.5 μl
AmpliTaQ™DNAポリメラーゼ	0.5 μl

サーマル・サイクラーの条件は、以下の通りである。

【0037】 94 °C 0.5 分

55 °C 2.0 分

72 °C 0.5 分

この条件下で反応を50サイクル行った後、さらに72°Cで7分間インキュベートした。反応液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、増幅された約1.6-kbのDNA断片を単離・精製した。このDNA断片を制限酵素HindIIIおよびSalIで処理し、同じく両酵素で処理したpUC19にクローニングし、pPMSalを得た。

【0038】次にターミネーター領域のクローニングを行った。pLGG100を制限酵素DraIおよびHincIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ターミネーター領域である約0.48-kb DraI/HincII断片を単離・精製した。このDNA断片をpUC9のSmaI部位にクローニングし、pT7を得た。

【0039】更にプロモーターおよびコード領域とターミネーター領域の連結を行った。pT7を制限酵素BamHIおよびEcoRIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ターミネーター領域である約0.49-kb BamHI/EcoRI断片を単離・精製した。このDNA断片を同じく制限酵素BamHIおよびEcoRIでpPMSalを部分分解処理して得た約4.3-kb EcoRI/BamHI断片にクローニングし、pY4'を得た (図2)。

## 【0040】実施例2

## ザルコファエーガ・ペレグリナ由来のザーペシン発現カセットpS2の構築

ザーペシンの遺伝子はセンチニクバエ胚由来の株化細胞であるNIH-Sape-4細胞を培養し、公知の方法 (J. Biol. Chem., 263, 17117-17121 (1988)) により取得することが可能である。ザーペシン前駆体をコードするDNAをpY4'のペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロコード領域とターミネーターの間に挿入するため、PCR法を用いてそのDNA断片を作製した。PCR反応のための上流プライマーとして、

S2-a: 5'-ATCCGTCGACTCGCCTGCTGCAGCTGCTGA-3'

下流プライマーとして、

S-b: 5'-AATAGGATCCCTTAATTGCGACATACGCAG-3'

8

をサイクロンプラスDNA合成機 (ミリジェン・バイオサーチ社製) を用いて合成した。PCR反応は、Gene Amp™ kit (パーキンエルマージャパン社製) を用い、同社のサーマル・サイクラー (DNA増幅装置) により行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

## 【0041】

H <sub>2</sub> O	62.5 μl
[10x] Reaction buffer	10.0 μl
dNTPs, Mix., 1.25 mM	16.0 μl
上流プライマー S2-a, 20 μM	5.0 μl
下流プライマー S-b, 20 μM	5.0 μl
Template, 1 ng/μl	1.0 μl
AmpliTaQ™DNAポリメラーゼ	0.5 μl

サーマル・サイクラーの条件は、以下の通りである。

【0042】 94 °C 1.0 分

45 °C 2.0 分

72 °C 2.0 分

この条件下で反応を25サイクル行った後、さらに72°Cで7分間インキュベートした。反応液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、増幅された約0.22-kbのDNA断片を単離・精製した。

【0043】次にこのDNA断片を制限酵素SalIおよびBamHIで処理し、またpY4'を制限酵素XhoIおよびBamHIで部分分解処理した後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、PCR産物である約0.22-kbのSalI/BamHI断片およびpY4'由来の約3.8-kbのXhoI/BamHI断片を単離・精製した。得られた2つのDNA断片をライゲーションすることによりプラスミドpS2'を得た。

【0044】更にpS2'におけるモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロのコード領域と前駆体ザーペシンのコード領域の接合部に見られる不必要な塩基 (シトシン) の欠失を Mutan-K (宝酒造社製) を用いた部位特異的変異導入法により行いプラスミドpS2を得た (図3)。

## 【0045】実施例3

## ザルコファエーガ・ペレグリナ由来のザーペシン発現カセットpS3の構築

ザーペシン前駆体をコードするDNAをpY4'のペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロおよびN末端コード領域とターミネーターの間に挿入するため、PCR法を用いてそのDNA断片を作製した。PCR反応のための上流プライマーとして、

S3-a: 5'-ATCCGAATTCTCGCTGCTGCAGCTGCTGA-3'

下流プライマーとして、S-b を実施例2と同様に合成し、PCR反応を行った。反応液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、増幅された約0.22-kbのDNA断片を単離・精製した。

【0046】次にこのDNA断片を制限酵素EcoRIおよびBamHIで処理し、またpY4'を制限酵素EcoRIおよびBamHI

Iで部分分解処理した後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、PCR産物である約0.22-kbのEcoRI/BamHI断片およびpY4'由来の約3.9-kbのEcoRI/BamHI断片を単離・精製した。得られた2つのDNA断片をライゲーションすることによりプラスミドpS3を得た(図4)。

#### 【0047】実施例4

##### ザルコファエーガ・ペレグリナ由来のザーペシン発現カセットpS4の構築

ザーペシン前駆体をコードするDNAをpY4'のペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロおよび成熟蛋白質コード領域とターミネーターの間に挿入するため、実施例2と同様にPCR法を用いてそのDNA断片を作製した。

【0048】次にこのDNA断片とpY4'を制限酵素SalIおよびBamHIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、PCR産物である約0.22-kbのSalI/BamHI断片およびpY4'由来の約4.7-kbのSalI/BamHI断片を単離・精製した。得られた2つのDNA断片をライゲーションすることによりプラスミドpS4を得た(図5)。

#### 【0049】実施例5

##### ザルコファエーガ・ペレグリナ由来のザーペシン発現カセットpS5の構築

ザーペシン成熟体をコードするDNAをpY4'のペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロおよび成熟蛋白質コード領域とターミネーターの間に挿入するため、PCR法を用いてそのDNA断片を作製した。PCR反応のための上流プライマーとして、

S5-a: 5'-CTACGTCGACGCCACTTGCGATTATTAG-3'

下流プライマーとして、S-b を実施例2と同様に合成し、PCR反応を行った。反応液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、増幅された約0.13-kbのDNA断片を単離・精製した。

【0050】次にこのDNA断片とpY4'を制限酵素SalIおよびBamHIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、PCR産物である約0.13-kbのSalI/BamHI断片およびpY4'由来の約4.7-kbのSalI/BamHI断片を単離・精製した。得られた2つのDNA断片をライゲーションすることによりプラスミドpS5'を得た。

【0051】更にpS5'における成熟体モノおよびジアシルグリセロールリパーゼのコード領域と成熟体ザーペシンのコード領域の接合部に見られる不必要な塩基(5'-GTGAC-3')の欠失を実施例2と同様に部位特異的変異導入法により行い、プラスミドpS5を得た(図6)。

#### 【0052】実施例6

##### ①形質転換プラスミドpH1の構築

実施例1に記載した、プラスミドpLGG300およびpLGG100 [Gene, 103, 61 (1991)] の両プラスミドは、約2.0-kb HindIII断片が互いに逆方向に挿入されている。この

モノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子は、ペニシリウム・カマンベルチイより公知の方法 [Gene, 103, 61 (1991)] により取得することが可能である。また薬剤耐性マーカー遺伝子としては大腸菌のハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子を有するプラスミドpHph0 (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いた。

【0053】モノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーター領域および翻訳開始コドンから7アミノ酸残基目までを含むDNA断片は、pLGG300を鋳型としてPCR法により増幅した。PCR反応のための上流プライマーとして、

LGP-a: 5'-CAAGCTTCCGGGAGTAAATTTTC-3'

下流プライマーとして、

LGP-b: 5'-TGTCGACCTGTGAAGAAAGAGAGACGCAT-3'

をサイクロンプラスDNA合成機(ミリジェン・バイオサーチ社製)を用いて合成した。PCR反応は、Gene Amp<sup>TM</sup> kit (パーキンエルマー・ジャパン社製)を用い、同社のサーマル・サイクラー(DNA増幅装置)により行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

#### 【0054】

H <sub>2</sub> O	62.5 μl
[10x] Reaction buffer	10.0 μl
dNTPs, Mix., 1.25 mM	16.0 μl
上流プライマー-LGP-a, 20 μM	5.0 μl
下流プライマー-LGP-b, 20 μM	5.0 μl
pLGG300, 2 ng/μl	1.0 μl
Ampli Taq <sup>TM</sup> DNAポリメラーゼ	0.5 μl

サーマル・サイクラーの条件は、以下の通りである。

#### 30 【0055】93 °C 1.0 分

55 °C 1.0 分

72 °C 1.0 分

この条件下で反応を50サイクル行った後、さらに72°Cで7分間インキュベートし、反応液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、増幅された約0.6-kbのDNA断片を単離・精製した。このDNA断片を制限酵素HindIIIおよびSalIで処理し、同じく両酵素で処理したpUC19にクローニングし、pP2を得た。

【0056】次にターミネーター領域を、以下のようにしてpHph0のハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子の下流にクローニングした。pLGG100を制限酵素DraIおよびHincIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ターミネーター領域である約0.48-kb DraI/HincII断片を単離・精製し、このDNA断片をpHph0のSmaI部位にクローニングし、pT6を得た。

【0057】更にモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーター領域および翻訳開始コドンから7アミノ酸残基目までを含むDNA断片を、以下のようにしてpT6のハイグロマイシンBホストトランスフェ

ラーゼ遺伝子中の蛋白質のN末端コーディング領域に存在する制限酵素部位にクローニングした。pP2を制限酵素HindIIIおよびSalIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、約0.57-kb HindIII/SalI断片を単離・精製し、このDNA断片を同じく制限酵素HindIIIおよびSalIで処理したpT6にクローニングし、pH1を得た。

【0058】この様にして得られたpH1は、pHph0がコードしていたハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ蛋白質の翻訳開始コドンから10残基目までのアミノ酸配列が、モノおよびジアシルグリセロールリパーゼの翻訳開始コドンから7残基目までのアミノ酸配列と置き変わった融合型のハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ蛋白質をコードするDNAを有している。そしてこの融合型のハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ蛋白質をコードするDNAの上流および下流にペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーター、ターミネーターがそれぞれ配置されている。

#### 【0059】②形質転換プラスミドpH4の構築

pH1へのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子の挿入を容易にするため、以下のようにしてpH1を改変し、pH4を作製した。pH1を制限酵素HindIIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、融合薬剤耐性遺伝子を含む約2.2-kb HindIII断片を単離・精製し、このDNA断片をDNAブランチング・キット（宝酒造社製）を用いて両末端を平滑化した後、pUC19の制限酵素SmaI部位にサブクローニングし、pH4を得た。

【0060】このプラスミドは、約2.2-kb HindIII断片が互いに逆方向に挿入されており、また、pH1において2ヶ所存在した制限酵素HindIII部位が1ヶ所になっている。

#### 【0061】③ザルコファーガ・ペレグリナ由来のザーペシンのペニシリウム・カマンベルチイでの発現

ペニシリウム・カマンベルチイに対する形質転換-発現プラスミドを構築するため、pS2、pS3、pS4およびpS5を制限酵素HindIIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ザーペシン発現カセットであるそれぞれ約1.3、1.4、2.2、2.1-kb HindIII断片を単離・精製した。これらのDNA断片をペニシリウム・カマンベルチイに対する形質転換ベクターpH4のHindIII部位にクローニングし、pSH2、pSH3、pSH4およびpSH5を得た（図7）。

【0062】これらpSH2、pSH3、pSH4およびpSH5を用いて、ペニシリウム・カマンベルチイを、以下に示す方法で形質転換した。

【0063】ペニシリウム・カマンベルチイの孢子懸濁液（ $2 \times 10^8$ /ml）100  $\mu$ lを100mlのぶどう糖・ペプトン培地（栄研化学社製）に接種し30℃で48時間振とう培養

後、培養物をろ過し菌体を集めた。この菌体を10 mlのプロトプラスト化バッファー [0.8M NaCl、10mM リン酸緩衝液 (pH6.0)] に懸濁しろ過することにより、洗浄菌体を集めた。この洗浄菌体を、5mg/mlのライジング・エンザイム (Sigma Product number L-2265、シグマ社製) を含むプロトプラスト化バッファーに懸濁し、30℃で2時間振とう後、ガラスフィルター3G2でろ過し、ろ液を2000rpm、5分の遠心分離に供し、プロトプラストを沈殿物として得、この沈殿物を10mlのソルビトール溶液 [1.2M ソルビトール、50mM CaCl<sub>2</sub>、10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)] に懸濁し、2000rpm、5分の遠心分離し沈殿物を集めた。この操作を再度繰り返した後、沈殿物を $2 \times 10^8$ /mlとなるようソルビトール溶液に懸濁し、プロトプラスト溶液を得た。

【0064】次にプロトプラスト溶液50  $\mu$ lに、4  $\mu$ lのpH1溶液 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)、6.75  $\mu$ lのPEG溶液 [50% PEG4000、50mM CaCl<sub>2</sub>、10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)] を加え混合後、氷上に30分静置し、0.5mlのPEG溶液を加え混合し、さらに1.0mlのソルビトール溶液を加え混合した。この混合液300  $\mu$ lを、17mlの1.5%アガロースを含むPDS [0.25% 大豆油、0.25% モノオレイン、1.2M ソルビトール、2.4% ポテト・デキストロース・ブロス (Difco社製)] からなるプレート上に載せ、さらに予め48℃に保温しておいた0.7%アガロースを含むPDS 3.0mlを注ぎ、混合後固化させた。30℃で24時間放置後、613  $\mu$ g/mlのハイグロマイシンB (シグマ社製)、0.7%アガロースを含むPDS 3.0mlを重層し、30℃で4日間放置し、プレート上に出現したコロニー10株をランダムにピック・アップし、それぞれ100mlの大豆油培地 (3%大豆油、0.5%酵母エキス、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.003% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.001% FeSO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) に接種し、30℃で6日間振とう培養し、得られた培養物をろ過し菌体を除去した。

【0065】得られた培養液について、ウサギ抗ザーペシン抗体を用いてウエスタンブロッティング分析を行ない、それぞれpSH2、pSH3、pSH4およびpSH5形質転換体のうち最もザーペシン生産性の高かった株SH2-9、SH3-2、SH4-5、SH5-3培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す（図8）。

【0066】尚、ここでH-1株は、形質転換ベクターpH4を用いて得られた形質転換体であり、H-1培養液にはザーペシンと同じ抗原性および分子量を持つ蛋白質の分泌は、見られないが、SH2-9、SH3-2、SH4-5およびSH5-3培養液にはザーペシンと同じ抗原性および分子量を持つ蛋白質の分泌が見られた。

【0067】これらはペニシリウム・カマンベルチイが発現したザーペシンと思われ、その生産性は、それぞれ約0.5、5、10および7mg/lであることが推算された。そして、ペニシリウム・カマンベルチイのモノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロおよび成熟蛋白

10

20

30

40

50



質コード領域とターミネーターの間にザーペシン前駆体をコードする遺伝子を挿入した場合に最もザーペシンの高生産が見られた。

【0068】SH4-5は、モノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロ領域および成熟蛋白質をコードするDNAの下流に前駆体ザーペシンをコードするDNA断片を連結した遺伝子を導入したもので、産生されたザーペシンは、ザーペシン本来のプロセッシング部位で切断されたものと考えられる。

【0069】一方、SH5-3は、モノおよびジアシルグリセロールリパーゼのプレプロ領域およびC末端アミノ酸1残基が欠失した成熟蛋白質をコードするDNAの下流に成熟体ザーペシンをコードするDNA断片を連結した遺伝子を導入したもので、産生されたザーペシンは、融合蛋白質の接合部に存在するLys-Ar g部位でプロセッシングされたものと推定される。

【0070】SH4-5およびSH5-3の培養液中には、それぞれ約46および43kDaのプロセッシングされずに残っていると思われる、モノおよびジアシルグリセロールリパーゼとザーペシンの融合蛋白質に相当する分子量の蛋白質の分泌が見られた。

#### 【0071】実施例7

リコンビナントザーペシンの精製とその抗菌活性の測定  
まず、SH4-5株培養液200mlを（特開平4-335883）の方法に従いCMセルロースカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより処理し、得られた各分画のスタフィロコッカス・アウレウスに対する抗菌活性を測定した。次に、活性分画を（特開昭63-185997）の方法に従いHPLC逆相クロマトグラフィーを用いて吸着、分離および分画処理することにより精製し、約1.4mgの精製標品が得られた（約7mg/l）。得られたサンプルをSDSポリアクリルアミド電気泳動を行って、そのゲルを銀染色した（図9）。

【0072】図から明かなように、精製サンプルは天然型ザーペシンと同じ分子量の位置に一本のバンドが見られるのみで他にはいかなるバンドも観察されず、十分に精製されたことが確認され、この精製サンプルの天然型ザーペシンに対する比活性を測定した（図10）。

【0073】その結果、精製サンプルの抗菌活性は天然型ザーペシンほぼ同じであったことから、ペニシリウム・カマンベルチイ U-150株にザーペシン遺伝子を導入することによりリコンビナントザーペシンが分泌発現されたことが示唆された。

#### 【0074】実施例8

##### ①プラスミドpN3の構築

アスペルギルス・オリゼに対する形質転換ベクターpSTA14 [Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)] を以下のように改変しpN3を作製した。pSTA14を制限酵素HindIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、niaD遺伝子を含む約5.5-kb HindIII断片を

単離・精製した。このDNA断片をDNAブランチング・キット（宝酒造社製）を用いて両末端を平滑化した後、pUC19の制限酵素SmaI部位にサブクローニングし、pN3を得た（図11）。

##### 【0075】②ザルコファーガ・ペレグリーナ由来のザーペシンのアスペルギルス・オリゼでの発現

形質転換-発現プラスミドを構築するため、実施例4で得られたpS4を制限酵素HindIIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ザーペシン発現カセットである約2.2-kb HindIII断片を単離・精製した。このDNA断片をアスペルギルス・オリゼに対する形質転換プラスミドpN3のHindIII部位にクローニングし、pSN4を得た（図12）。

【0076】次にこのpSN4を用いて、アスペルギルス・オリゼA01.1株 (Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)) を、アングルスの方法 (Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)) に準じて形質転換した。選択培地に生育してきた形質転換体10株 (SN4-1~SN4-10) をランダムにピック・アップし、それぞれ100mlの大豆油培地 (3%大豆油、0.5%酵母エキス、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.003% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.001% FeSO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) に接種し、30℃で4日間振とう培養し、得られた培養物をろ過し菌体を除去し、得られた培養液について、ウェスタンブロッティング分析を行った。

【0077】その結果、培養液にはザーペシンと同じ抗原性および分子量を持つ蛋白質の分泌が見られ、ザーペシン生産性は、最も高生産株 (SN4-3) で約3 mg/lであることが推算された。

##### 【0078】実施例9

##### ザルコファーガ・ペレグリーナ由来のザーペシンの酵母サッカロマイセス・セレビシエでの発現

酵母サッカロマイセス・セレビシエに対する形質転換-発現プラスミドを構築するため、実施例4で得られたpS4を制限酵素HindIIIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、ザーペシン発現カセットである約2.2-kb HindIII断片を単離・精製した。このDNA断片をサッカロマイセス・セレビシエに対する形質転換ベクターpL1 (Biosci. Biotech. Biochem., 56, 315-319 (1992)) のHindIII部位にクローニングし、pSL4（図13）を得た。

【0079】次にこのpSL4を用いて、サッカロマイセス・セレビシエSHY2 (ATCC 44770) を、伊藤らの方法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) で形質転換した。選択培地に生育してきた形質転換体1株をピック・アップし、20 mg/mlのウラシル、20 mg/mlのトリプトファン、20 mg/mlのヒスチジンを含む最小培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acid (Difco)) 50 ml に接種し、30℃で24時間振とう培養した。得られ培養液1 mlを、0.003%のCuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>Oを含む

YPGal培地 (2% ガラクトース、2% ポリペプトン、1% 酵母エキス) 50 mlに接種し、30℃で48時間振とう培養し、得られた培養物を遠心分離し菌体を除去し、得られた培養液を限外ろ過膜 (ウルトラフリーC3LGC、日本ミリポア社製) を用いて20倍に濃縮し、ウェスタンブロッティング分析を行った。

【0080】その結果、濃縮培養液にはザーペシンと同じ抗原性および分子量を持つ蛋白質の分泌が見られ、ザーペシン生産性は、約0.02 mg/lであることが推算された。

【0081】

【発明の効果】本発明によれば、産業上有用な酵素、ホルモン、生理活性ペプチドもしくは蛋白質を糸状菌により菌体外に大量に製造することが可能となった。また、同時に酵母によっても発現せしめることが出来、機能改変ポリペプチドの創製を企図する蛋白工学的手法の適用が容易となり、産業上寄与するところ大である。

【0082】

\*

\* 【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpLGR80の構築手順を示す。

【図2】プラスミドpY4'の構築手順を示す。

【図3】プラスミドpS2の構築手順を示す。

【図4】プラスミドpS3の構築手順を示す。

【図5】プラスミドpS4の構築手順を示す。

【図6】プラスミドpS5の構築手順を示す。

【図7】プラスミドpSH2、pSH3、pSH4およびpSH5の制限酵素地図を示す。

10 【図8】各種形質転換体のザーペシン生産性を示す。

【図9】リコンビナントザーペシンのSDSポリアクリルアミド電気泳動図を示す。

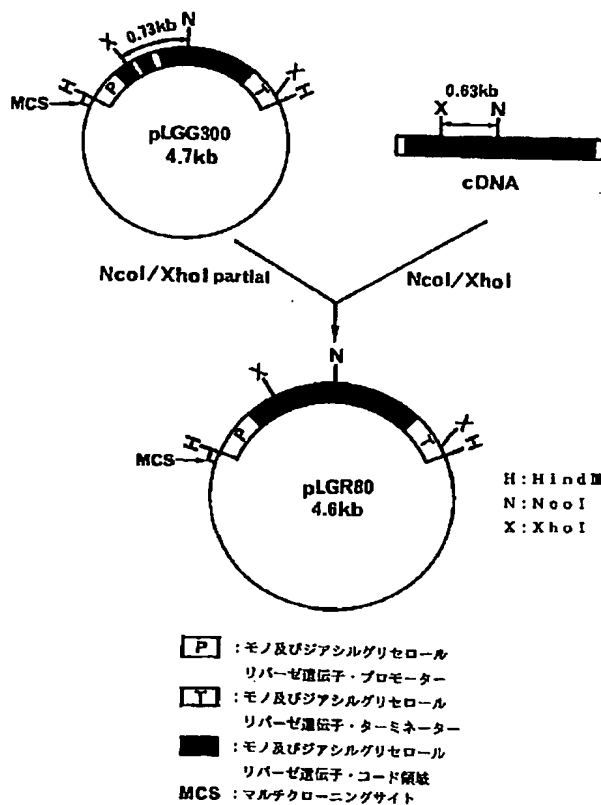
【図10】リコンビナントザーペシンの天然型ザーペシンに対する非活性を測定した図を示す。

【図11】プラスミドpN3の構築手順を示す。

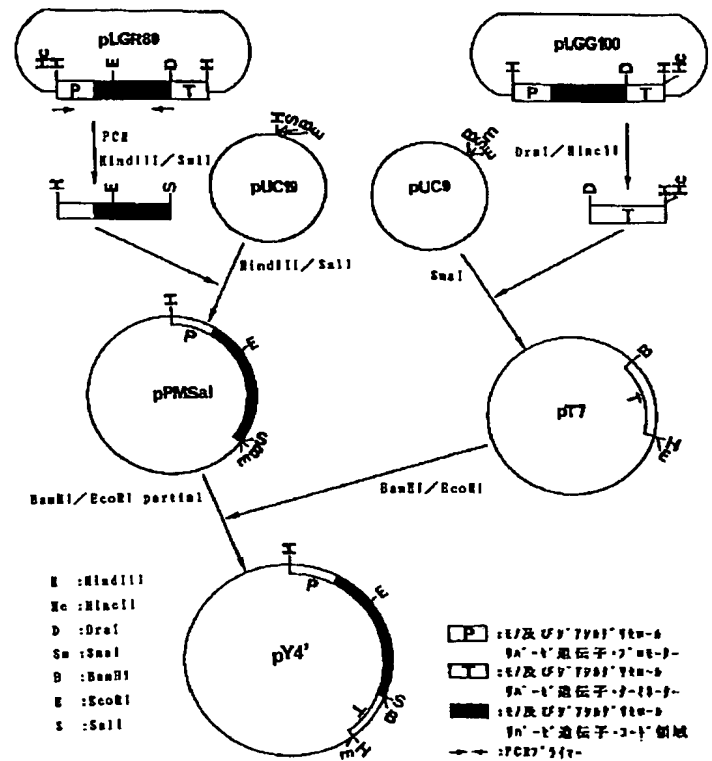
【図12】プラスミドpSN4の制限酵素地図を示す。

【図13】プラスミドpSL4の制限酵素地図を示す。

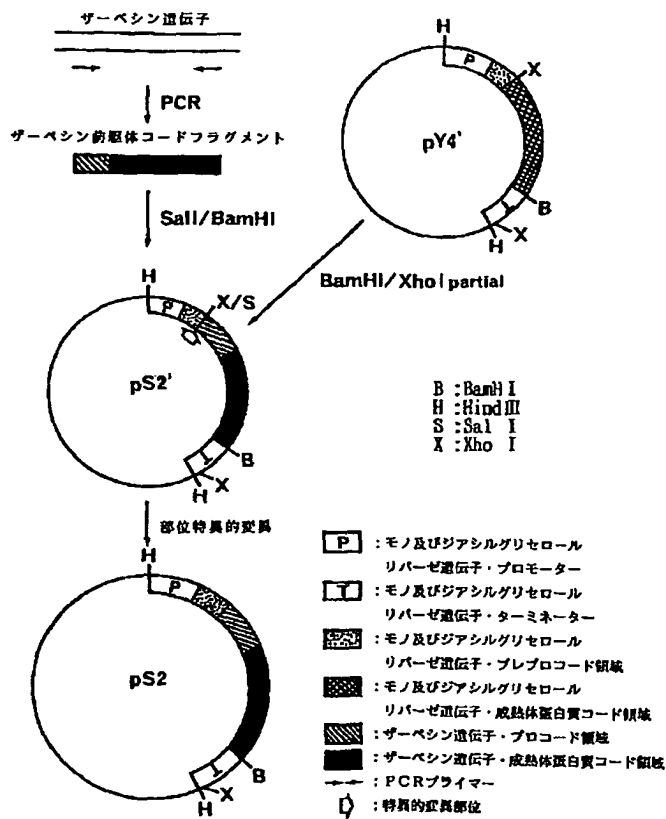
【図1】



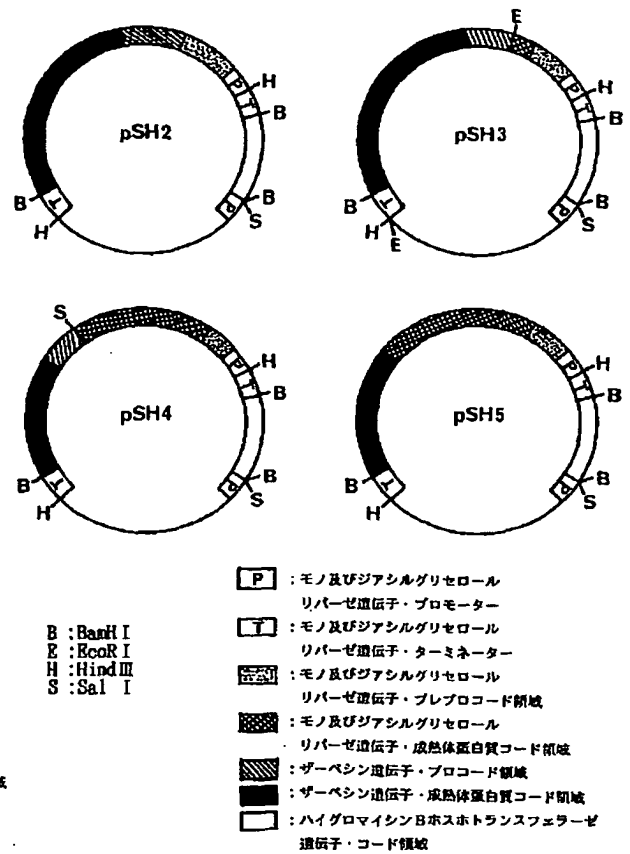
【図2】



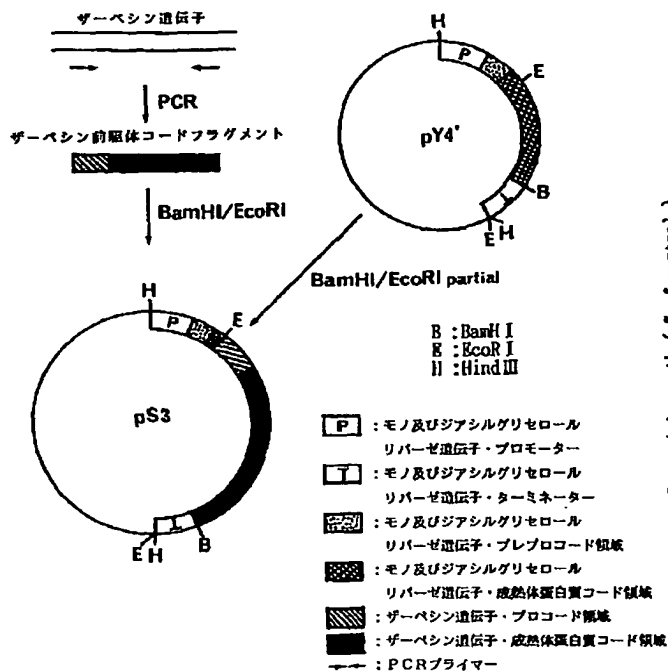
【図3】



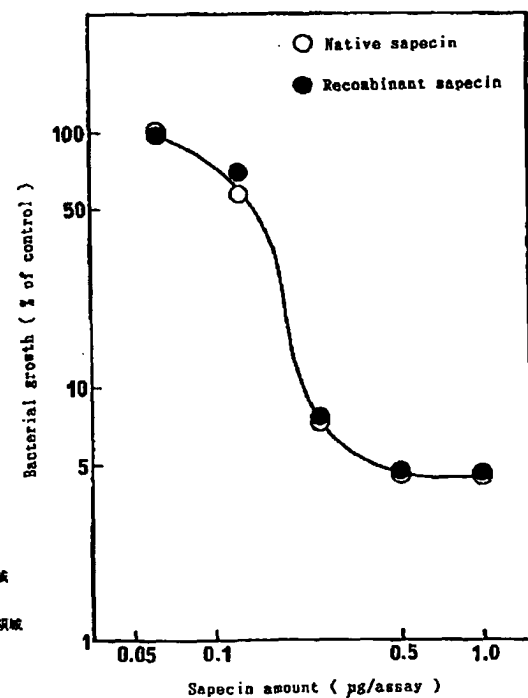
【図7】



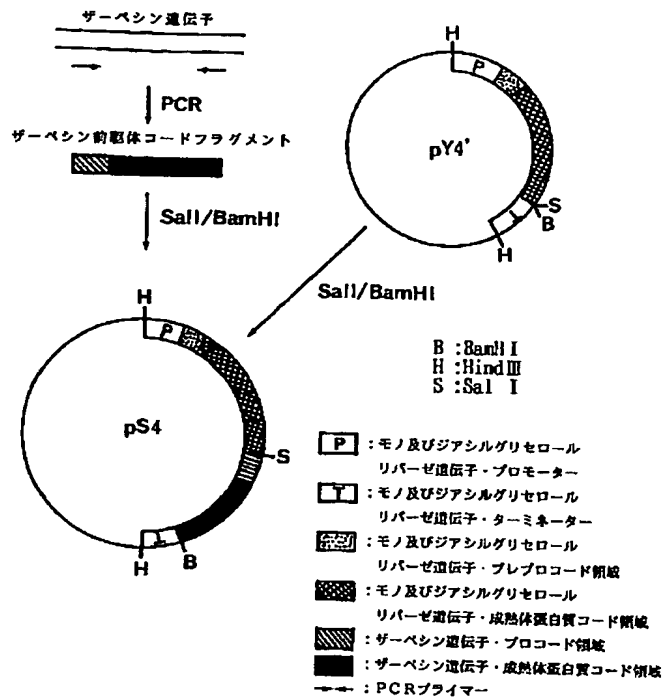
【図4】



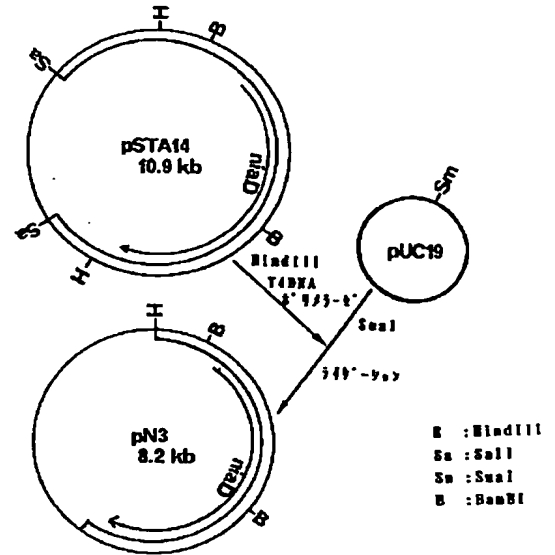
【図10】



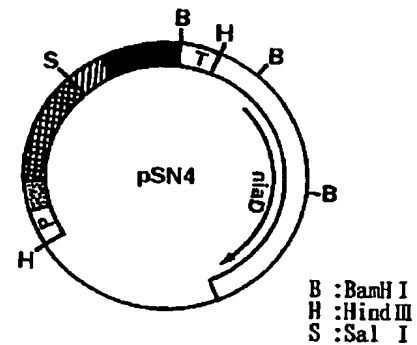
【図5】



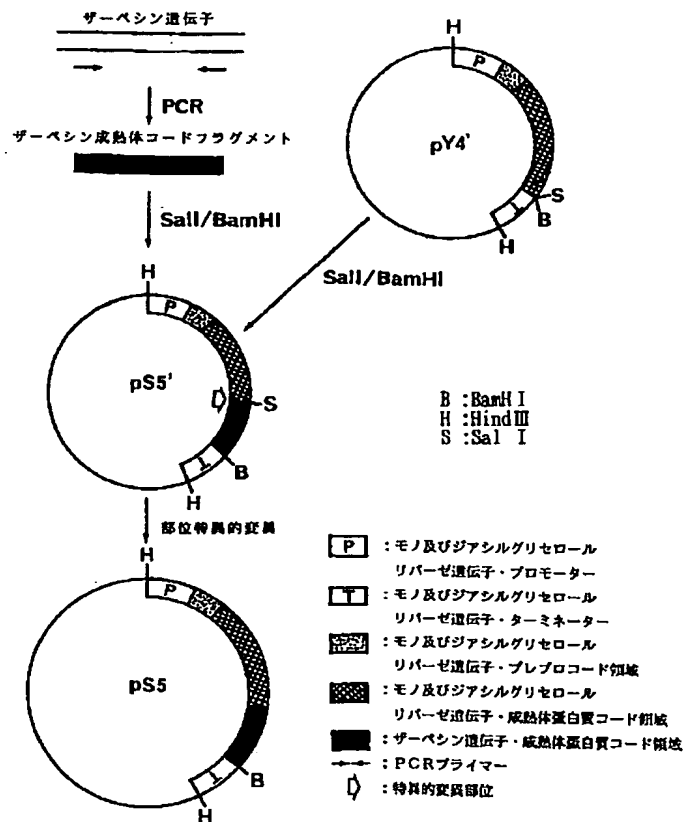
【図11】



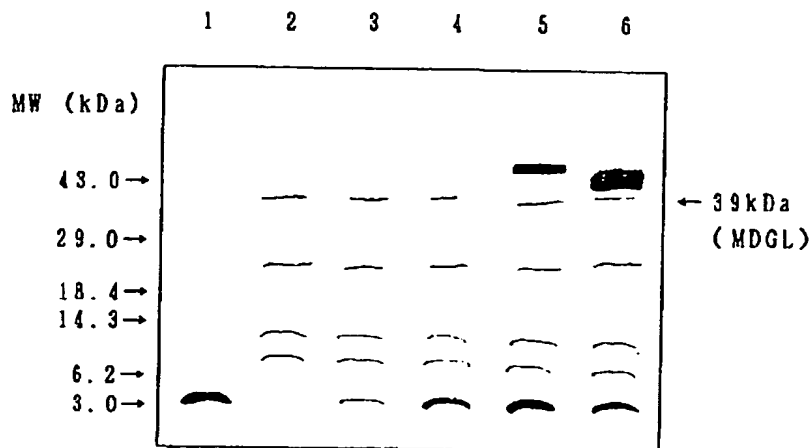
【図12】



【図6】



【図 8】



レーン 1 : 天然型ザーベシン

レーン 2 : H-1培養液

レーン 3 : SH2-9培養液

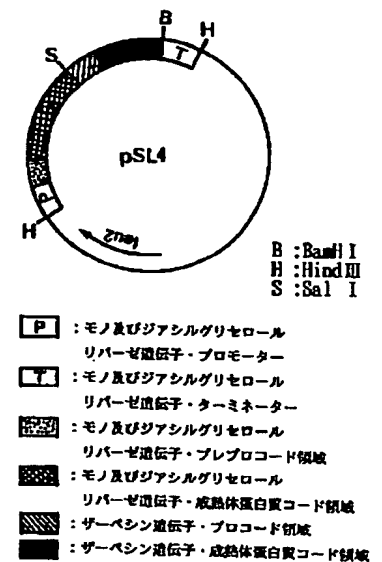
レーン 4 : SH3-2培養液

レーン 5 : SH4-5培養液

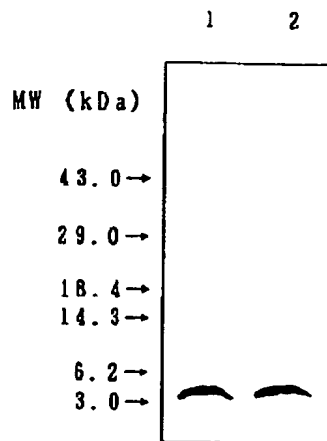
レーン 6 : SH5-3培養液

(MDGL:モノおよびジアシルグリセロールリパーゼ)

【図 13】



【図 9】



レーン 1 : 天然型ザーベシン

レーン 2 : 精製標品

#### 【手続補正書】

【提出日】平成 6 年 10 月 27 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

#### 【補正内容】

【0057】更にモノおよびジアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーター領域および翻訳開始コドンから 7 アミノ酸残基目までを含む DNA 断片を、以下のようにして p T 6 のハイグロマイシン B ホストトランスフ

エラーゼ遺伝子中の蛋白質のN末端コーディング領域に存在する制限酵素部位にクローニングした。pP2を制限酵素HindIIIおよびSalIで処理後、分解混合液を1.0%低融点アガロース電気泳動に供し、約0.57-kb HindIII/SalI断片を単離・精製し、このDNA断片を同じく制限酵素HindIIIおよびSalIで処理したpT6にクローニングし、pH1を得た。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正内容】

【0064】次にプロトプラスト溶液50μlに、4μlのDNA溶液(1μg/μl)、6.75μlのPEG溶液:50%PEG4000、50mM CaCl<sub>2</sub>、10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)]を加え混合後、氷上に30分静置し、0.5mlのPEG溶液を加え混合し、さらに1.0mlのソルビトール溶液を加え混合した。この混合液300μlを、17mlの1.5%アガロースを含むPDS[0.25/大豆油、0.25%モノオレイン、1.2Mソルビトール、2.4%ポテト・デキストロース・ブロス(Difco社製)]からなるプレート上に載せ、さらに予め48℃に保温しておいた0.7%アガロースを含むPDS 3.0mlを注ぎ、混合後固化させた。30℃で24時間放置後、613μg/mlのハイグロマイシンB(シグマ社製)、0.7%アガロースを含むPDS 3.0mlを重層し、30℃で4日間放置し、プレート上に出現したコロニー10株をランダムにピック・アップし、それぞれ100mlの大豆油培地(3%大豆油、0.5%酵母エキス、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.003% CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、0.001% FeSO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O)に接種し、30℃で6日間振とう培養し、得られた培養物をろ過し菌体を除去した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正内容】

【0079】次にこのpSL4を用いて、サッカロマイセス・セレビシエSHY2(ATCC 44770)を、伊藤らの方法(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983))で形質転換した。選択培地に生育してきた形質転換体1株をピック・アップし、20mg/mlのウラシル、20mg/mlのトリプトファン、20mg/mlのヒスチジンを含む最小培地(2%グルコース、0.67%Yeast Nitrogen Base w/o amino acid(Difco))50mlに接種し、30℃で24時間振とう培養した。得られた培養液1mlを、0.003%のCuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>Oを含むYPGA1培地(2%ガラクトース、2%ポリペプトン、1%酵母エキス)50mlに接種し、30℃で48時間振とう培養し、得られた培養物を遠心分離し菌体を除去し、得られた培養液を限外ろ過膜(ウルトラフリーC3LGC、日本ミリポア社製)を用いて20倍に濃縮し、ウェスタンブロッティング分析を行った。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpLGr80の構築手順を示す。

【図2】プラスミドpY4'の構築手順を示す。

【図3】プラスミドpS2の構築手順を示す。

【図4】プラスミドpS3の構築手順を示す。

【図5】プラスミドpS4の構築手順を示す。

【図6】プラスミドpS5の構築手順を示す。

【図7】プラスミドpSH2、pSH3、pSH4およびpSH5の制限酵素地図を示す。

【図8】各種形質転換体のザープシン生産性を示す。

【図9】リコンビナントザープシンのSDSポリアクリルアミド電気泳動図を示す。

【図10】リコンビナントザープシンの天然型ザープシンに対する比活性測定した図を示す。

【図11】プラスミドpN3の構築手順を示す。

【図12】プラスミドpSN4の制限酵素地図を示す。

【図13】プラスミドpSL4の制限酵素地図を示す。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

(C12P 21/02

C12R 1:80)

(C12P 21/02

C12R 1:865)

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所